

明 細 書

転写因子KLF5の活性化抑制作用を有する医薬

技術分野

[0001] 本発明は、非環式ポリプレニル系化合物を有効成分として含み、転写因子KLF5の活性化を抑制する作用を有する医薬に関するものである。

背景技術

[0002] 近年、動脈硬化をはじめとする血管疾患が急増しており、高齢化社会を迎えたわが国において血管疾患の予防又は治療のための医薬の開発は非常に重要な課題である。血管平滑筋の増殖は、動脈硬化や虚血性心疾患の治療として行われる冠動脈血行再建術後の再狭窄の発症に深く関わっている。しかしながら、損傷した血管の平滑筋の性質や個体発生の過程にある血管の特徴・性質については未だ十分に解明されていない。平滑筋の分化と発生を担う分子機構の解明は、動脈硬化に代表される血管平滑筋が関与している血管疾患の予防薬・治療薬の開発の糸口となる可能性がある。また、平滑筋細胞は形質の可塑性を示すという特徴がある。正常な血管では分化した収縮型の形質の細胞が認められるのに対して、血管病変では増殖能を有する脱分化した平滑筋細胞への形質の変換が認められる。平滑筋細胞の脱分化の機序を理解することは、血管疾患の病態を解明し、さらに新しい治療法を開発するための糸口となる。

[0003] 本発明者らは、脱分化した平滑筋に特異的に発現する平滑筋ミオシン重鎖遺伝子の発現調節の研究を通して、同遺伝子の発現調節を担う転写調節因子KLF5 (Kruppel-like factors5)/BTEB2/IKLF (以下、本明細書において「KLF5」と略す場合がある)を単離することに成功した(Circulation Research, 85, pp.182-191, 1999)。KLF5は、胎児及び新生児期に血管に発現し、成体では発現が低下するが、動脈硬化等の血管病変では発現が誘導される。KLF5の発現を抑えるアンチセンス実験では平滑筋特異的に増殖が抑制されることから、KLF5は平滑筋の増殖を司る重要な因子と考えられる。従って、KLF5の活性を抑制する作用を有する医薬を開発すれば血管疾患の予防及び治療のための新しい医薬として有用であることが期待される。

[0004] 本発明者らは、KLF5が動脈硬化を悪化させるタンパクのプロモーターに結合して高い発現活性が誘導される特性を利用して平滑筋細胞の形質変換を制御する物質の評価方法及びこのような評価方法に用いる宿主細胞を提供する方法を見出した(特開平11-318450号公報)。さらに、本発明者らはKLF5のノックアウト・マウスの作成にも成功した(Nature Medicine, 8, pp.856-863, 2002)。このノックアウト・マウスでは、ホモ接合体は胎生致死性であり、また、ヘテロ接合体の成仔は一見正常であるが、血管障害に対する内膜過形成反応の低下、アンジオテンシンIIIによる心肥大と線維化の低下などが顕著であった。さらに、ヘテロ接合体では、血小板由来増殖因子(PDGF)が野生型の半分程度にまで低下しており、PDGFがKLF5の転写制御の標的遺伝子であることが判明した。また、レチノイン酸誘導体(レチノイン酸アゴニスト: Am80)は、細胞を用いたレポーターアッセイでKLF5によるPDGF-Aの転写を抑制し、また、野生型マウスへの投与により障害血管の新生内膜形成を抑制した。一方、レチノイン酸アンタゴニストはPDGF-Aの転写を促進し、野生型マウスに投与したところ障害血管の新生内膜形成を促進した(Nature Medicine, 8, pp.856-863, 2002)。

[0005] 一方、非環式ポリプレニル系化合物の一つである(2E,4E,6E,10E)-3,7,11,15-テトラメチル-2,4,6,10,14-ヘキサデカペンタエン酸(以下、この物質を本明細書において「NIK-333」と呼ぶ場合がある)は、レチノイン酸結合蛋白及びレチノイン酸受容体に対して親和性を示し、肝細胞癌に対して分化誘導作用及びアポトーシス誘導作用を有することが知られている。臨床においては、NIK-333は一年間の長期投与により肝癌根治治療後の再発を有意に抑制し、肝癌再発抑制作用を有することが示唆されている。さらに、NIK-333は、肝機能障害及び他のレチノイドに認められる副作用をほとんど有しておらず、安全性の高い医薬として有用である(N. Eng. J. Med., 334, pp.1561-1567, 1996)。しかしながら、これまで非環式ポリプレニル系化合物が転写因子であるKLF5の活性化を抑制することは全く知られておらず、さらにこの物質が血管リモデリング抑制作用及び動脈硬化抑制作用を有することは知られていない。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、転写調節因子KLF5の活性化抑制作用を有する医薬を提供することを

課題としている。また、転写調節因子KLF5の活性化抑制作用を有し、血管リモデリング及び動脈硬化を抑制する作用を有する医薬を提供することも本発明の課題である。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは上記の課題を解決すべく、転写調節因子KLF5の活性化抑制作用を有する化合物を鋭意探索した。その結果、NIK-333などの非環式ポリプレニル系化合物が転写調節因子KLF5の活性化を抑制すること、及び該非環式ポリプレニル系化合物が血管リモデリング及び動脈硬化を抑制する作用を有することを見出した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

[0008] すなわち、本発明により、転写因子KLF5の活性化を抑制する作用を有する医薬であって、非環式ポリプレニル系化合物を有効成分として含む医薬が提供される。また、本発明により、血管リモデリング抑制作用を有する医薬であって、非環式ポリプレニル系化合物を有効成分として含む医薬、及び動脈硬化抑制作用を有する医薬であって、非環式ポリプレニル系化合物を有効成分として含む医薬が提供される。

[0009] 上記の発明の好ましい態様によれば、非環式ポリプレニル系化合物がポリプレニルカルボン酸である上記の医薬；非環式ポリプレニル系化合物が3,7,11,15-テトラメチル-2,4,6,10,14-ヘキサデカペンタエン酸である上記の医薬；及び非環式ポリプレニル系化合物が(2E,4E,6E,10E)-3,7,11,15-テトラメチル-2,4,6,10,14-ヘキサデカペンタエン酸である上記の医薬が提供される。さらに好ましい態様によれば、有効成分である非環式ポリプレニル系化合物とともに薬学的に許容される製剤用添加物を含む医薬組成物の形態である上記医薬；及び経口投与用の医薬組成物の形態である上記の医薬が提供される。

[0010] 別の観点からは、上記の医薬の製造のための非環式ポリプレニル系化合物の使用；及びヒトを含む哺乳類動物の生体内において転写因子KLF5の活性化を抑制する方法であって、非環式ポリプレニル系化合物の有効量をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を含む方法；血管リモデリングを抑制する方法であって、非環式ポリプレニル系化合物の有効量をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を含む方法；及び動脈硬化を予防する方法であって、非環式ポリプレニル系化合物の有効量をヒトを含

む哺乳類動物に投与する工程を含む方法が提供される。

発明の効果

- [0011] 本発明の医薬は転写因子KLF5の活性化を抑制する作用を有しており、血管リモデリングの抑制及び動脈硬化の抑制などに有用である。

図面の簡単な説明

- [0012] [図1]図1はCOS1細胞にKLF5とRAR α をコトランスフェクションさせ、NIK-333を負荷し、ルシフェラーゼアッセイを行った結果を示す図である。
- [図2]図2はCOS1細胞にKLF5とRAR α をコトランスフェクションさせ、NIK-333及びATRAを負荷し、ルシフェラーゼアッセイを行った結果を示す図である。
- [図3]図3はCOS1細胞にKLF5とRAR β 、 γ をコトランスフェクションさせ、NIK-333及びATRAを負荷し、ルシフェラーゼアッセイを行った結果を示す図である。
- [図4]図4は3T3細胞にNIK-333又はATRAを負荷し、24、36、及び48時間後の生細胞数を計測した結果を示す図である。
- [図5]図5は3T3-KLF5細胞及び対照細胞にNIK-333又はATRAを負荷し、生細胞数を計測した結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

- [0013] 本発明の医薬の有効成分として用いられる非環式ポリプレニル系化合物は、数個の直鎖イソブレン単位を含む化合物のことである。非環式ポリプレニル系化合物の末端の官能基の種類は特に限定されない。例えば、末端に第一級アリル水酸基を有するポリプレニルアルコール(ポリプレノール)、ポリプレノールの末端水酸基が有機酸とエステルを形成した化合物、末端にカルボキシル基を有するポリプレニルカルボン酸などを挙げることができるが、これらに限定されることはない。好ましくはポリプレニルカルボン酸を用いることができる。非環式ポリプレニル系化合物としては純粋な形態の任意の幾何異性体又は幾何異性体の任意の混合物を用いることができる。本発明に好適に用いられる非環式ポリプレニル化合物は3,7,11,15-テトラメチル-2,4,6,10,14-ヘキサデカペンタエン酸であり、特に好適には(2E,4E,6E,10E)-3,7,11,15-テトラメチル-2,4,6,10,14-ヘキサデカペンタエン酸を用いることができる。この化合物は特公昭63-32058号公報及びJ. Chem. Soc. (c), 2154,

1966に記載されている公知物質であり、上記刊行物に記載された方法により容易に製造できる。また、その他の非環式ポリプレニル化合物も上記刊行物に記載された方法を参照することにより当業者に容易に製造することができる。

[0014] 本発明の医薬としては、非環式ポリプレニル系化合物をそのまま投与してもよいが、通常は1又は2種以上の製剤用添加物とともに医薬組成物を調製して投与することが望ましい。本発明の医薬の投与経路は特に限定されず、経口投与又は非経口投与のいずれの投与経路を選択することも可能である。経口投与に適する医薬組成物としては、例えば、錠剤(素錠又は糖衣錠など)、顆粒剤、細粒剤、散剤、シロップ剤、溶液剤、カプセル剤(硬カプセル剤又は軟カプセル剤など)、又は懸濁剤などを挙げることができる。非経口投与に適する製剤の例としては、例えば、注射剤、点滴剤、吸入剤、噴霧剤、坐剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤などを挙げることができる。

[0015] 製剤用添加物としては、例えば、安定化剤、界面活性剤、可塑剤、滑沢剤、可溶化剤、緩衝剤、甘味剤、基剤、吸着剤、矯味剤、結合剤、懸濁化剤、光沢化剤、コーティング剤、着香剤・香料、湿潤剤、湿潤調節剤、充填剤、消泡剤、咀嚼剤、清涼化剤、着色剤、糖衣剤、等張化剤、pH調節剤、軟化剤、乳化剤、粘着剤、粘着増強剤、粘稠剤、粘稠化剤、発泡剤、賦形剤、分散剤、噴射剤、崩壊剤、崩壊補助剤、芳香剤、防湿剤、防霉剤、保存剤、無痛化剤、溶剤、溶解剤、溶解補助剤、流動化剤などを挙げることができ、これらを2種以上組み合わせて用いてもよい。これらの製剤用添加物の具体例は、例えば、医薬品添加物事典(日本医薬品添加剤協会編集、薬事日報社発行)に説明されているので、当業者は医薬組成物の形態に応じて適宜の製剤用添加物を選択し、当業界で汎用する方法に従って所望の形態の医薬組成物を製造することができる。例えば、製剤用添加物としてセルロース誘導体、ゼラチン、植物油、ポリエチレングリコール、又は生物学的に調和する溶媒などを用いることができる。また、PCT/JP03/10440号の明細書には3,7,11,15-テトラメチル-2,4,6,10,14-ヘキサデカペンタエン酸を含む軟カプセル剤が開示されており、この軟カプセル剤は本発明の医薬として好適に利用可能である。

[0016] 本発明の医薬はヒトを含む哺乳類動物において転写因子KLF5の活性化を抑制する作用を有する。本発明の医薬の上記作用は、本明細書の実施例に具体的に説明

した方法により当業者が容易に確認できる。また、本発明の医薬は、上記の転写因子KLF5活性化抑制作用に基づいて、血管リモデリング及び／又は動脈硬化を抑制する作用を有している。動脈硬化の進展にかかわる高血圧などの病態では、血管にかかる種々の負荷に反応して血管壁の細胞構築が変化し、血管のリモデリングが生じることが知られている。血管リモデリングとは、血流量変化や血管壁の張力の変化などの血行動態変化に対してもたらされる血管の構造上の変化のことである。血管リモデリング及び／又は動脈硬化に対する本発明の医薬の抑制作用についても、本明細書の実施例に具体的に示した方法（例えば線維芽細胞の細胞増殖に対する抑制作用及びカフ障害モデルを用いた評価など）により当業者が容易に確認できる。

- [0017] 本発明の医薬の投与量及び投与回数は特に限定されないが、通常は有効成分重量として一日投与量を0.001 mg〜1,200 mg程度の間で選択することができ、典型的には成人一日あたり100 mg〜1,000 mg程度である。上記の投与量は患者の年齢や体重などの条件、疾患の種類などに応じて適宜増減することが望ましい。また、上記の一日投与量を数回に分けて投与することもできる。

実施例

- [0018] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

例1-1: 転写因子KLF5活性化に対する効果

COS1細胞を24ウェルプレートに 5×10^4 個/ウェルの割合でまき、37°Cの5% CO₂ インキュベータで12時間培養した。トランスフェクションはTransFast（登録商標、プロメガ社製）トランスフェクション試薬を用い、そのプロトコールに従って行った。すなわち、pCAG/KLF5またはその空ベクター（pCAG）、pCMX/RAR α またはその空ベクター（pCMX）及びPDGF-A promoter(-900)-Luciferaseを添加し、37°Cの5% CO₂ インキュベータで48時間培養した。NIK-333はジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解して 10^{-7} 〜 10^{-5} Mとなるように添加した。その後、Dual Luciferase Reporter Assay System（プロメガ社製）を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。その結果を図1に示す。KLF5の空ベクターとRAR α の空ベクター（Lane1）、KLF5のみの遺伝子導入（Lane2）、及びRAR α のみの遺伝子導入（Lane3）に比較してKLF5とRAR α の遺伝子導入により

PDGF-Aプロモーター活性化が認められた(Lane4)。このRAR α 強発現下におけるKLF5依存のPDGF-Aプロモーター活性化作用はNIK-333により抑制された(Lane5、6、7)。さらに、NIK-333の作用には 10^{-7} Mから濃度依存性が認められた。従って、NIK-333は転写因子KLF5活性化抑制作用を有することが分かった。

[0019] 例1-2. 転写因子KLF5活性化に対する効果

COS1細胞を24ウェルプレートに 5×10^4 個/ウェルの割合で播き、37°Cの5% CO₂ インキュベーターで一晩培養した。トランスフェクションはTransFast(登録商標、プロメガ社製)トランスフェクション試薬を用い、そのプロトコールに従って行った。すなわち、pCAG/KLF5またはその空ベクター(pCAG)、pRSh/RAR α , β , γ またはその空ベクター(pRS-RSV) およびPDGF-A promoter(-900)-Luciferaseを添加し、37°Cの5% CO₂ インキュベーターで48時間培養した。NIK-333はジメチルスルホキシド(DMSO)で溶解して 10^{-12} ~ 10^{-5} Mとなるように添加した。その後、Dual Luciferase Reporter Assay System(プロメガ社製)を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。その結果を図2及び3に示す。KLF5の空ベクターとRAR α の空ベクター(Lane1)、RAR α のみの遺伝子導入(Lane2)、及びKLF5のみの遺伝子導入(Lane3)に比較してKLF5とRAR α の遺伝子導入(Lane4)によりPDGF-Aプロモーター活性化が認められた。このRAR α 強発現下におけるKLF5依存のPDGF-Aプロモーター活性化作用はNIK-333により抑制された(Lane5-12)。この作用は 10^{-10} Mから有意に、濃度依存的に抑制し、オールートランスレチノイン酸(ATRA)よりも強力であることが認められた。同様にRAR γ 強発現下におけるKLF5依存のPDGF-Aプロモーター活性化作用はNIK-333により抑制され、ATRAよりも強力であることが認められた。一方、RAR β 強発現下におけるKLF5依存のPDGF-Aプロモーター活性化作用はNIK-333により影響を受けないことが認められた。NIK-333はRAR(α , γ)強発現下においてKLF5のPDGF-Aプロモーター活性化作用を抑制し、この作用はATRAよりも強力であることが認められた。従ってNIK-333は転写因子KLF5活性化抑制作用を有することが分かった。

[0020] 例2: 線維芽細胞3T3細胞増殖に対する効果

線維芽細胞由来である3T3細胞を24ウェルプレートに 1×10^6 個/ウェルの割合でまき、12時間放置した。その後、NIK-333及びATRAを 10^{-7} ~ 10^{-1} Mとなるように添加し

24、36、及び48時間後に生細胞数を計測した。NIK-333とATRAはDMSOに溶解した。その結果、NIK-333は 10^{-7} Mから濃度依存性に細胞増殖を抑制し、その作用はATRAよりも強いことが確認された(図4)。従って、NIK-333は動脈硬化の原因とされている線維芽細胞の増殖を抑制し、動脈硬化を抑制する作用を有するものと考えられる。

[0021] 例3-1: マウスのカフ障害モデルにおける効果

カフ障害モデルを用いて血管リモデリング解析を行った。血管リモデリングに関してこのモデルの有用性が報告されている(Physiol. Genomics., 2, pp.13-30, 2000; Circulation, 104, pp.2716-2721, 2001; Circulation, 106, pp.847-853, 2002)。実験には雄性C57BL6/Nマウス8週齢(10匹/群)を使用した。大豆油に溶解したNIK-333 50mg/kgをカフ処理(ポリエチレンチューブを血管の外側に被せる処理)7日前から屠殺前日まで1日1回連日経口投与した。対照として大豆油のみを同様に投与した。前投薬7日ののち右大腿動脈にカフとしてPE50(ポリエチレンチューブ50)を被せた。5週間後屠殺し採血、左心室穿刺灌流固定にてカフ取り上げを行った。病理評価はヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。その結果、カフによる血管傷害で生じた血管内膜の肥厚は、NIK-333投与群ではコントロール群と比較してI/M(内膜/中膜)比の減少が認められた。

[0022] [表1]

処 理	I/M 比
溶媒 (大豆油)	0.93 ± 0.35
NIK-333 50mg/kg	0.87 ± 0.29
NIK-333 100mg/kg	0.76 ± 0.31

[0023] 例3-2. マウスカフ障害モデルにおける効果

カフ障害モデルを用いて血管リモデリング解析を行った。血管リモデリングに関してこのモデルの有用性が報告されている(Physiol. Genomics., 2, pp.13-30, 2000; Circulation, 104, pp.2716-2721, 2001; Circulation, 106, pp.847-853, 2002)。実験には雄性C57BL6/Nマウス8週齢(10匹/群)を使用した。大豆油に懸濁したNIK-333 100、200 mg/kgあるいはATRA 5、10mg/kgをカフ処理(ポリエチレンチューブを血管の外側に被せる処理)7日前から屠殺前日まで1日1回連日経口投与した。対照として大豆油の

みを同様に投与した。前投薬7日ののち右大腿動脈にカフとしてPE50(ポリエチレンチューブ50、外径0.965mm、長さ約1.5mm)を被せた。5週間後屠殺し採血、左心室穿刺灌流固定にてカフ取り上げを行った。病理評価はエラスチカ・ワンギーソン(Elastica van Gieson, EVG)染色を行った。その結果、カフによる血管障害で生じた血管内膜の肥厚は、NIK-333投与群でコントロール群と比較してI/M(中膜/内膜)比の減少が認められた。一方ATRAではコントロール群と差を認めなかった。

[0024] [表2]

処置	I/M 比 (Mean±S.D.)	
溶媒 (大豆油)	0.62±0.2	
NIK-333 100 mg/kg	0.38±0.2	P < 0.05
NIK-333 200 mg/kg	0.09±0.1	P < 0.01
ATRA 5 mg/kg	0.64±0.3	有意差なし
ATRA 10 mg/kg	0.63±0.2	有意差なし

[0025] 例4: マウス精巣重量に及ぼす影響

雄性C57BL6/Nマウス8週齢(10匹/群)を使用した。大豆油に溶解したNIK-333 50mg/kg及び100mg/kgを5週間1日1回連日経口投与した。対照として大豆油のみを同様に投与した。5週間後体重を測定し、屠殺後に精巣の肉眼的観察と精巣重量を測定した。その結果、NIK-333の5週間投与群(50及び100mg/kg)ではコントロール群と比較して体重及び精巣重量に変化は認められなかった。また、肉眼的観察においても精巣における異常所見は認められなかった。

[0026] [表3]

処置	体重 (g)	両側精巣重量 (g)
溶媒	21.1±0.3	0.1437±0.0036
NIK-333 50mg/kg	20.8±0.3	0.1465±0.0043
NIK-333 100mg/kg	21.2±0.3	0.1360±0.0026

[0027] 例5. KLF5安定細胞増殖への影響

KLF5を安定に発現させた細胞<3T3-KLF5細胞>(KLF5のcDNAを3×FLAG 発現ベクターにサブクローニングし3×FLAG-KLF5のコンストラクトを作成、そのコンストラクトを3T3細胞にトランスフェクションした後、2週間G418の存在下で培養、G418抵抗性の細胞をクローン化したもの。KLF5を含まない、同様に作成した対照群の細胞を3T3-mock細胞という)を10%FBS、penicillin G/streptomycin含有DMEM培地に1×

10^5 個/ウェル (6ウェルプレート) 播種し、一晚 37°C の5% CO_2 インキュベーターで培養後、penicillin G/ streptomycin含有DMEM培地(血清不含)に交換し、2時間後にDMSOに溶解したNIK-333を添加し、24時間培養後に細胞数を計測した。その結果を図5に示す。3T3-mock細胞および3T3-KLF5細胞においてDMSOに溶解したNIK-333、ATRAを 10^{-8} ～ 10^{-5} Mの濃度になるように添加すると、両細胞ともにNIK-333およびATRAの添加により濃度依存的に生細胞数の減少が認められた。3T3-mock細胞、3T3-KLF5細胞に対する作用はNIK-333の方がATRAよりも強力であった。NIK-333を添加した3T3-mock細胞と3T3-KLF5細胞を比較すると、3T3-KLF5細胞の方が細胞の生存率が高かった。従って、NIK-333存在下KLF5の有無により細胞生存率に差が生じたことから、NIK-333の作用はKLF5の作用に関与していることが示唆された。

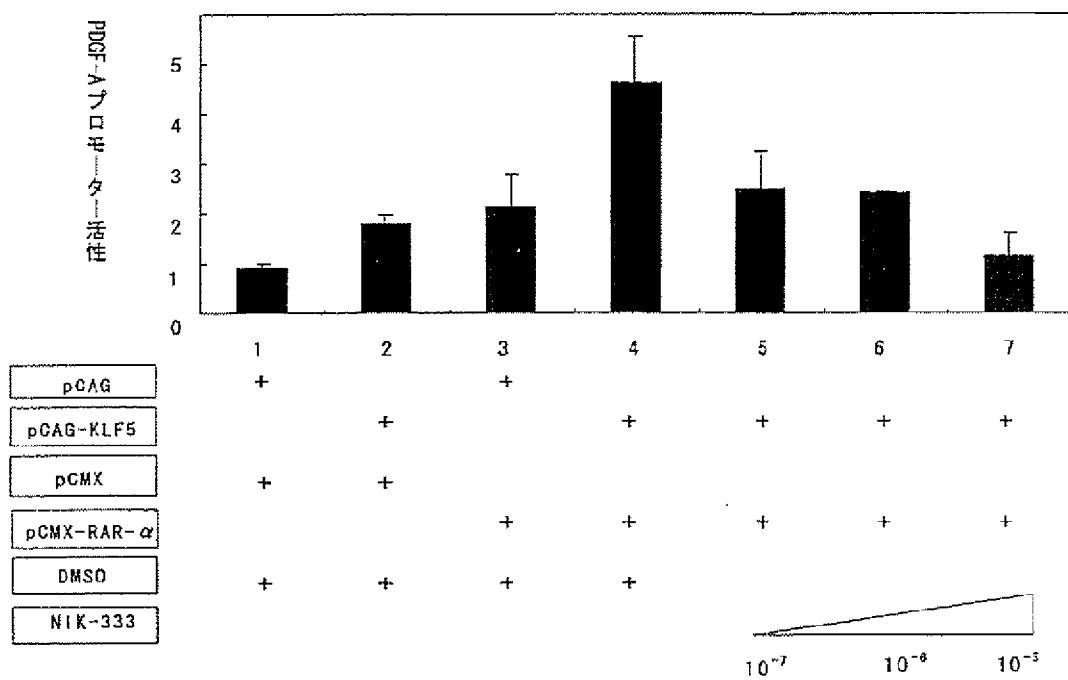
産業上の利用可能性

[0028] 本発明の医薬は転写因子KLF5の活性化を抑制する作用を有しており、血管リモデリングの抑制及び動脈硬化の抑制などに有用である。

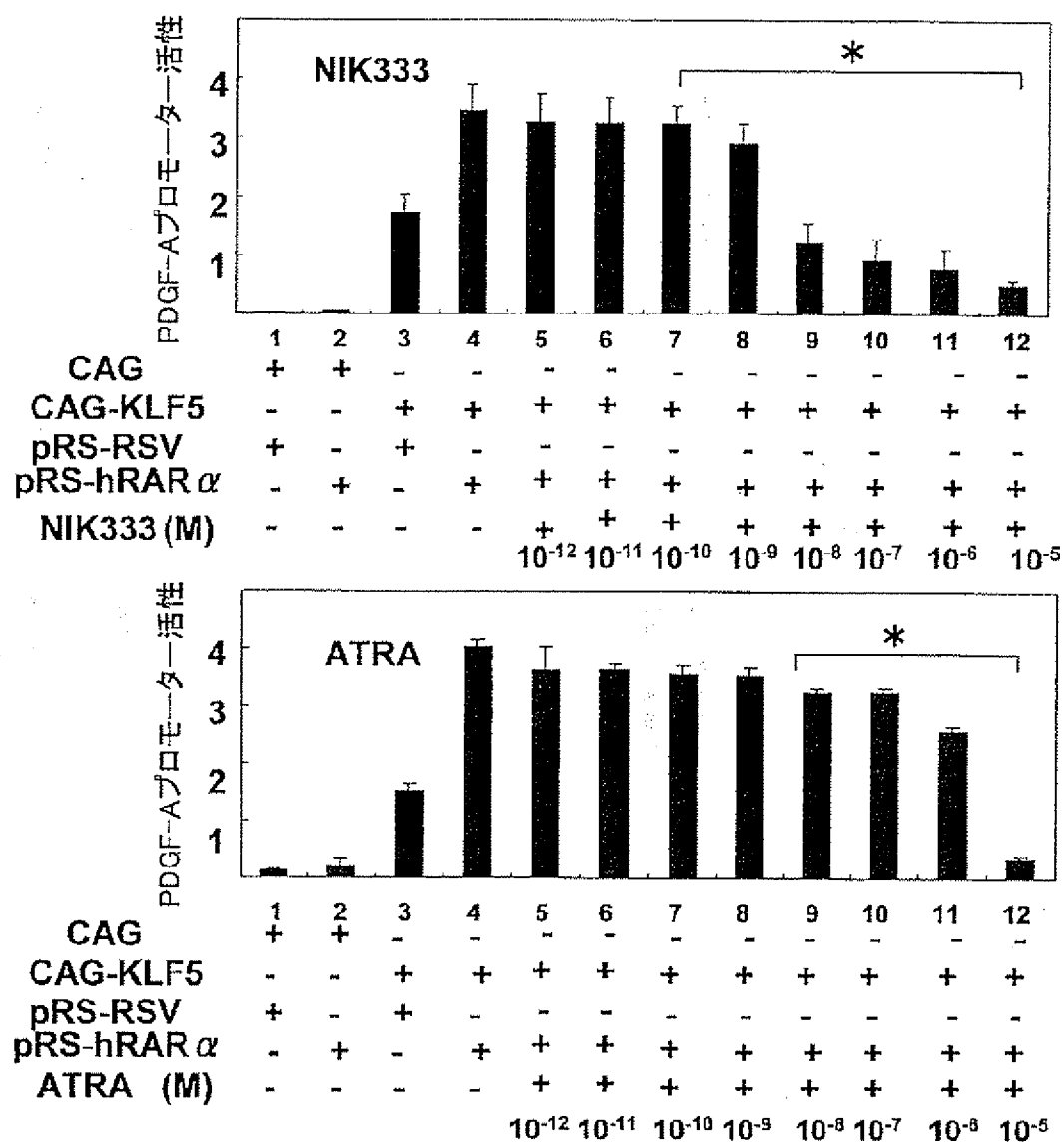
請求の範囲

- [1] 転写因子KLF5の活性化を抑制する作用を有する医薬であって、非環式ポリプレニル系化合物を有効成分として含む医薬。
- [2] 血管リモデリング抑制作用を有する医薬であって、非環式ポリプレニル系化合物を有効成分として含む医薬。
- [3] 動脈硬化抑制作用を有する医薬であって、非環式ポリプレニル系化合物を有効成分として含む医薬。
- [4] 非環式ポリプレニル系化合物がポリプレニルカルボン酸である請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載の医薬。
- [5] 非環式ポリプレニル系化合物が3,7,11,15-テトラメチル-2,4,6,10,14-ヘキサデカペンタエン酸である請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載の医薬。
- [6] 非環式ポリプレニル系化合物が(2E,4E,6E,10E)-3,7,11,15-テトラメチル-2,4,6,10,14-ヘキサデカペンタエン酸である請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載の医薬。
- [7] 有効成分である非環式ポリプレニル系化合物とともに薬学的に許容される製剤用添加物を含む医薬組成物の形態である請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載の医薬。
- [8] 経口投与用の医薬組成物の形態である請求の範囲第1項ないし第7項のいずれか1項に記載の医薬。

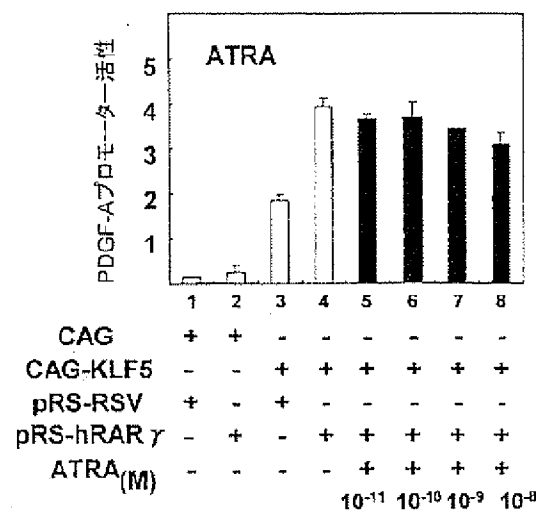
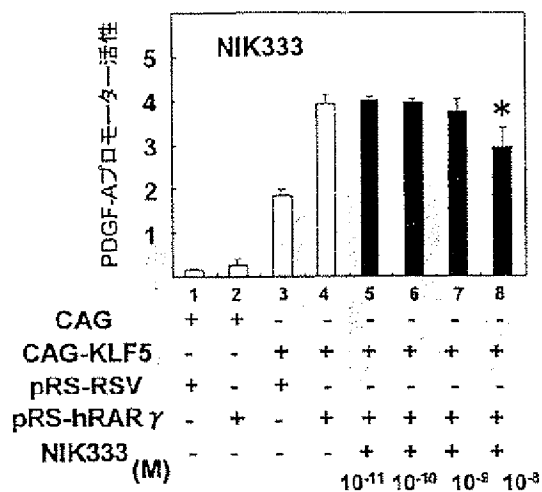
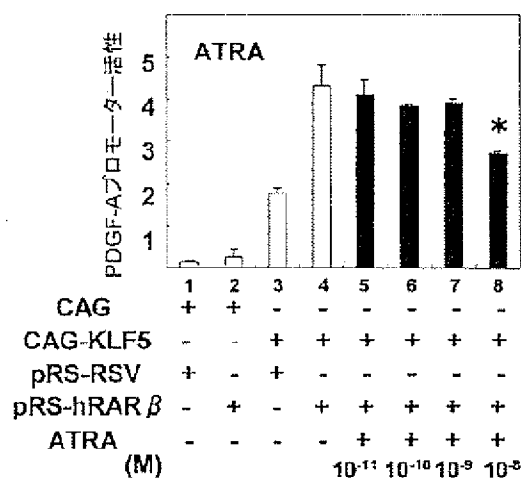
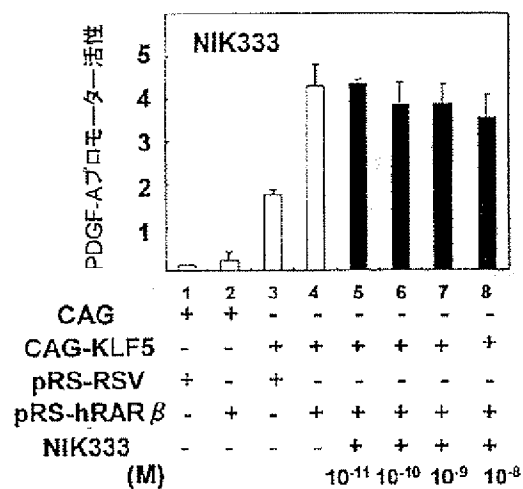
[図1]



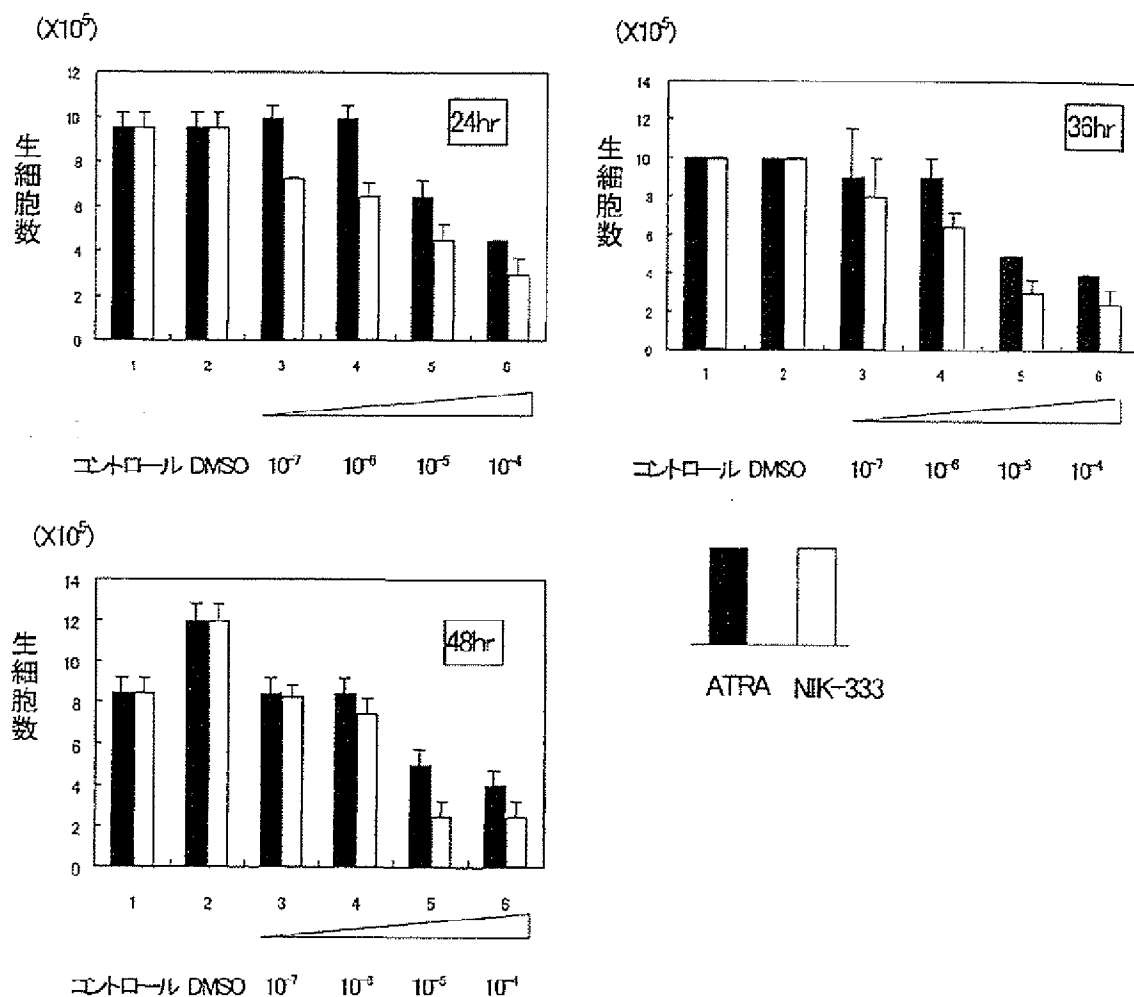
[図2]



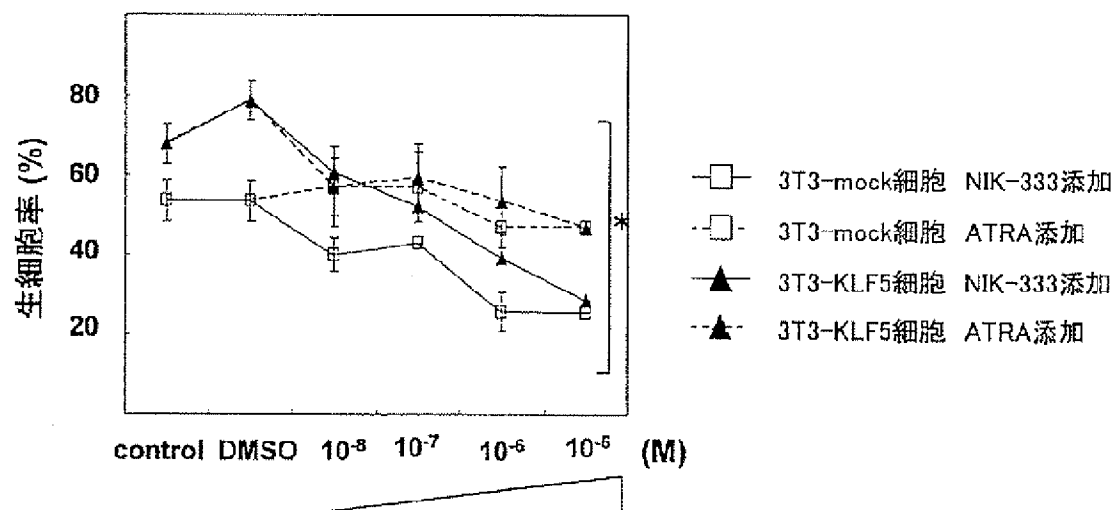
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002986

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K31/202, 45/00, A61P9/00, 9/10, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K31/202, 45/00, A61P9/00, 9/10, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (STN), Caplus (STN), MEDLINE (STN), PubMed, JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	George J. et al., Inhibition of intimal thickening in the rat carotid artery injury model by a nontoxic Ras inhibitor., Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004 Feb., Vol.24, No.2, pages 363 to 368	1-8
X	JP 56-140949 A (Eisai Co., Ltd.),	1-8
Y	04 November, 1981 (04.11.81), & US 4917829 A	1-8
Y	JP 7-112930 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 02 May, 1995 (02.05.95), Page 2, table 1-2 & US 4917829 A	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 17 May, 2005 (17.05.05)

Date of mailing of the international search report
 31 May, 2005 (31.05.05)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002986

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 61-210050 A (Eisai Co., Ltd.), 18 September, 1986 (18.09.86), Examples & EP 194693 A1	1-8
X	JP 59-101448 A (Eisai Co., Ltd.),	1-3, 7, 8
Y	12 June, 1984 (12.06.84), & EP 110397 A2	1-8
Y	JP 10-316617 A (Nippon Kayaku Co., Ltd.), 02 December, 1998 (02.12.98), (Family: none)	1-8
Y	JP 4-178348 A (Nikken Chemicals Co., Ltd.), 25 June, 1992 (25.06.92), (Family: none)	1-8
X	Yasutoshi MUTO et al., Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid, polyprenoic acid, in patients with hepatocellular carcinoma., N.Engl.J.Med. 13 June, 1996 (13.06.96), Vol.334, No.24, pages 1561 to 1567	1-8
P,A	Ichiro MANABE, "Kekkan Saibo no Signal Seigyo 6 Saibonai Signal o Hyoteki ni Shita Kekkan Heikatsukin Keishitsu Henkan Seigyo", Kekkan Igaku, 2004 April, Vol.5, No.2, pages 159 to 166	1-8
P,A	Masahiko KURABAYASHI, "Domyaku Koka 21 Seiki eno Tenbo, Kekkan Heikatsukin Saibo Kino to Keishitsu Henkan", Pharma Medica, 2005 May, Vol.18, No.5, pages 35 to 41	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/002986

As whether or not the expression "...capable of...inhibiting" appearing in claims 1-3 restricts the use of medicine is incomprehensible, the invention is unclear. In the event that the invention is restricted, as innumerable compounds are included in the acyclic polyprenyl compounds, the scope of compounds having such capability is unclear. In the description, only certain compounds are disclosed.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ A61K31/202, 45/00, A61P9/00, 9/10, 43/00			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ A61K31/202, 45/00, A61P9/00, 9/10, 43/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2005年 日本国実用新案登録公報 1996-2005年 日本国登録実用新案公報 1994-2005年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), PubMed, JSTPlus (JOIS)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
Y	George J. et al., Inhibition of intimal thickening in the rat carotid artery injury model by a nontoxic Ras inhibitor., Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004 Feb, Vol. 24, No. 2, p363-368	1-8	
X	JP 56-140949 A (エーザイ株式会社) 1981.11.04	1-8	
Y	& US 4917829 A	1-8	
Y	JP 7-112930 A (協和醗酵工業株式会社) 1995.05.0	1-8	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 17.05.2005		国際調査報告の発送日 31.5.2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 刈野 留香 電話番号 03-3581-1101 内線 3492	4P 9048

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	2, 2頁及び第1表の2 & US 4917829 A	
Y	JP 61-210050 A (エーザイ株式会社) 1986.09.18, 実施例 & EP 194693 A1	1-8
X	JP 59-101448 A (エーザイ株式会社) 1984.06.12 & EP 110397 A2	1-3, 7, 8
Y		1-8
Y	JP 10-316617 A (日本化薬株式会社) 1998.12.02 (ファミリーなし)	1-8
Y	JP 4-178348 A (日研化学株式会社) 1992.06.25 (ファミリーなし)	1-8
X	Yasutoshi Muto et al., Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid, polyprenoic acid, in patients with hepatocellular carcinoma. , N. Engl. J. Med. 1996 Jun 13, Vol. 334, No. 24, p1561-1567	1-8
P, A	真鍋一郎, 血管細胞のシグナル制御 6 細胞内シグナルを標的に した血管平滑筋形質変換制御 , 血管医学, 2004 April, VOL. 5 NO. 2, p159-166	1-8
P, A	倉林正彦, 動脈硬化 21世紀への展望 血管平滑筋細胞機能と 形質変換, Pharma Medica, 2005 May, VOL. 18, NO. 5, p35-41	1-8

請求項1-3の「・・・抑制・・・作用を有する」なる記載が医薬の用途を限定するものであるのか否かが理解できないために発明が不明確となっている。もし、発明を規定するものである場合、非環式ポリプレニル化合物には無数の化合物が包含されるところ、そのような活性を有する化合物の範囲が不明確であるし、明細書中には特定の化合物しか開示されていない。

特許協力条約

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)

〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 A51126M	今後の手続きについては、様式PCT/ISA/220 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 2005/002986	国際出願日 (日.月.年) 24.02.2005	優先日 (日.月.年) 25.02.2004
出願人(氏名又は名称) 国立大学法人東京大学		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った(PCT規則23.1(b))。

b. ☐ この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでいる(第I欄参照)。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第II欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第III欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第IV欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 図面に関して

a. 要約書とともに公表される図は、

第 1 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ 出願人は図を示さなかったので、国際調査機関が選択した。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表しているので、国際調査機関が選択した。

b. ☐ 要約とともに公表される図はない。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K31/202, 45/00, A61P9/00, 9/10, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K31/202, 45/00, A61P9/00, 9/10, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (STN), Caplus(STN), MEDLINE(STN), PubMed, JSTPlus(JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	George J. et al., Inhibition of intimal thickening in the rat carotid artery injury model by a nontoxic Ras inhibitor., Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004 Feb, Vol. 24, No. 2, p363-368	1-8
X	JP 56-140949 A (エーザイ株式会社) 1981.11.04	1-8
Y	& US 4917829 A	1-8
Y	JP 7-112930 A (協和醗酵工業株式会社) 1995.05.0	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17.05.2005

国際調査報告の発送日

31.5.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

淵野 留香

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

4 P

9048

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	2, 2頁及び第1表の2 & US 4917829 A	
Y	JP 61-210050 A (エーザイ株式会社) 1986.09.18, 実施例 & EP 194693 A1	1-8
X	JP 59-101448 A (エーザイ株式会社) 1984.06.12 & EP 110397 A2	1-3, 7, 8
Y		1-8
Y	JP 10-316617 A (日本化薬株式会社) 1998.12.02 (ファミリーなし)	1-8
Y	JP 4-178348 A (日研化学株式会社) 1992.06.25 (ファミリーなし)	1-8
X	Yasutoshi Muto et al., Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid, polyprenoic acid, in patients with hepatocellular carcinoma. ,N. Engl. J. Med. 1996 Jun 13, Vol. 334, No. 24, p1561-1567	1-8
P, A	真鍋一郎, 血管細胞のシグナル制御 6 細胞内シグナルを標的に した血管平滑筋形質変換制御 , 血管医学, 2004 April, VOL. 5 NO. 2, p159-166	1-8
P, A	倉林正彦, 動脈硬化 21世紀への展望 血管平滑筋細胞機能と 形質変換, Pharma Medica, 2005 May, VOL. 18, NO. 5, p35-41	1-8

請求項１－３の「・・・抑制・・・作用を有する」なる記載が医薬の用途を限定するものであるのか否かが理解できないために発明が不明確となっている。もし、発明を規定するものである場合、非環式ポリプレニル化合物には無数の化合物が包含されるところ、そのような活性を有する化合物の範囲が不明確であるし、明細書中には特定の化合物しか開示されていない。

特許協力条約

発信人 日本国特許庁 (国際調査機関)

代理人

特許業務法人特許事務所サイクス

様

あて名

〒104-0031

日本国東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖
ビル8階PCT
国際調査機関の見解書
(法施行規則第40条の2)
[PCT規則43の2.1]発送日
(日.月.年)

31.5.2005

出願人又は代理人

の書類記号 A51126M

今後の手続きについては、下記2を参照すること。

国際出願番号

PCT/J P 2005/002986

国際出願日

(日.月.年) 24.02.2005

優先日

(日.月.年) 25.02.2004

国際特許分類 (IPC) Int.Cl.⁷ A61K31/202, 45/00, A61P9/00, 9/10, 43/00

出願人 (氏名又は名称)

国立大学法人東京大学

1. この見解書は次の内容を含む。

- ☒ 第I欄 見解の基礎
☐ 第II欄 優先権
☐ 第III欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成
☐ 第IV欄 発明の単一性の欠如
☒ 第V欄 PCT規則43の2.1(a)(i)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
☐ 第VI欄 ある種の引用文献
☐ 第VII欄 国際出願の不備
☒ 第VIII欄 国際出願に対する意見

2. 今後の手続き

国際予備審査の請求がされた場合は、出願人がこの国際調査機関とは異なる国際予備審査機関を選択し、かつ、その国際予備審査機関がPCT規66.1の2(b)の規定に基づいて国際調査機関の見解書を国際予備審査機関の見解書とみなさない旨を国際事務局に通知していた場合を除いて、この見解書は国際予備審査機関の最初の見解書とみなされる。

この見解書が上記のように国際予備審査機関の見解書とみなされる場合、様式PCT/ISA/220を送付した日から3月又は優先日から22月のうちいずれか遅く満了する期限が経過するまでに、出願人は国際予備審査機関に、適当な場合は補正書とともに、答弁書を提出することができる。

さらなる選択肢は、様式PCT/ISA/220を参照すること。

3. さらなる詳細は、様式PCT/ISA/220の備考を参照すること。

見解書を作成した日

17.05.2005

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

渡野 留香

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

4 P

9048

様式PCT/ISA/237 (表紙) (2004年1月)

第1編 見解の基礎

1. この見解書は、下記に示す場合を除くほか、国際出願の言語を基礎として作成された。

☐ この見解書は、_____語による翻訳文を基礎として作成した。
それは国際調査のために提出されたPCT規則12.3及び23.1(b)にいう翻訳文の言語である。

2. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に不可欠なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき見解書を作成した。

a. タイプ ☐ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☐ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☐ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

3. ☐ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

4. 補正意見：

第V欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についてのPCT規則43の2.1(a)(i)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-8	無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-8	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-8	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明

文献：

1. George J. et al., Inhibition of intimal thickening in the rat carotid artery injury model by a nontoxic Ras inhibitor., Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004 Feb, Vol. 24, No. 2, p363-368
2. JP 56-140949 A
3. JP 7-112930 A
4. JP 61-210050 A
5. JP 59-101448 A
6. JP 10-316617 A
7. JP 4-178348 A
8. Yasutoshi Muto et al., Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid, polyprenolic acid, in patients with hepatocellular carcinoma. , N. Engl. J. Med. 1996 Jun 13, Vol. 334, No. 24, p1561-1567

・請求の範囲1-8は、国際調査報告で引用された文献2または8に記載されているので、新規性及び進歩性を有さない。文献2、8には、該文献記載の非環式ポリプレニルカルボン酸が本請求項1-3に記載のような作用を有する点の記載はないが、かかる請求項の規定は医薬発明を特定するものとは解されないから、請求の範囲1-8は、医薬自体として文献2または8に記載のものと区別できない。

・請求の範囲1-3、7、8は、国際調査報告で引用された文献5から新規性・進歩性を有さない。文献5には、ポリプレニル化合物であって、動脈硬化症等の治療に有効であるものが記載されており、該文献記載の非環式ポリプレニル化合物が本請求項1-3に記載のような作用を有する点についての記載はないが、かかる請求項の規定は医薬発明を特定するものとは解されないから、上記請求の範囲は、医薬自体として文献5に記載のものと区別できない。また、仮に本発明の医薬がKLF5活性化抑制剤等と解される場合であっても、具体的な医薬適用疾患が動脈硬化症である点で文献5に記載の医薬用途と区別できない。

第Ⅷ欄 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

請求項 1－3 の「・・・抑制・・・作用を有する」なる記載が医薬の用途を限定するものであるのか否かが理解できないために発明が不明確となっている。もし、発明を規定するものである場合、非環式ポリプレニル化合物には無数の化合物が包含されるところ、そのような活性を有する化合物の範囲が不明確であるし、明細書中には特定の化合物しか開示されていない。

補充欄

いずれかの欄の大きさが足りない場合

第 V 欄の続き

・医薬が動脈硬化治療剤である場合の請求の範囲 1－8 は、国際調査報告で引用された文献 1－7 から進歩性を有さない。文献 7 には、エイコサペンタエン酸類が動脈硬化症の治療に有効であることが記載されているところ、文献 1－6 にあげられているようにポリプレニル構造を有する化合物として動脈硬化の治療に有効なものが種々知られている。してみると、文献 7 と同様に長鎖ペンタエン酸化合物であり、かつポリプレニル構造を有する医薬化合物である文献 2 に記載の非環式ポリプレニルカルボン酸を動脈硬化の治療に使用してみることは当業者が容易に想到しうることである。

また、仮に本発明の医薬が KLF5 活性化抑制剤等と解される場合であっても、医薬適用疾患が動脈硬化症である点で医薬用途に違いはない。